

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-276162

(43)Date of publication of application : 12.10.1999

(51)Int.Cl.

C12N 9/04
C12N 9/06
// C07K 1/10

(21)Application number : 10-105729

(71)Applicant : AMANO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 31.03.1998

(72)Inventor : YAMAGUCHI SHOTARO

(54) CROSSLINKING OF PROTEIN WITH ENZYME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a protein crosslinking agent enabling a protein such as albumin whose crosslinking has hitherto been unsuccessful to be a crosslinked polymer and giving a polymerized or gelatinized protein having new quality by using a multi-copper oxidase as an active component.

SOLUTION: The protein crosslinking agent capable of crosslinking and polymerizing a protein such as albumin whose crosslinking has hitherto been unsuccessful by the use of a microbial transglutaminase which is the sole enzyme available in the market and giving a polymerized or gelatinized protein having new quality is produced by using a multi-copper oxidase such as laccase and/or bilirubin oxidase as an active component and dissolving the component in a potassium-sodium phosphate buffer solution (pH7.0). The polymerized or gelatinized protein is useful in a food processing field such as ground fish meat paste, boiled fish paste, fish meat and cattle meat sausage, etc., or as a material for cosmetics and microcapsules and a carrier for immobilized enzyme, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-276162

(43) 公開日 平成11年(1999)10月12日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | F I | |
|---------------------------|------|--------------|---|
| C 1 2 N 9/04 | | C 1 2 N 9/04 | E |
| | | 9/06 | C |
| // C 0 7 K 1/10 | | C 0 7 K 1/10 | |

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 8 頁)

| | | | |
|-----------|------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平10-105729 | (71) 出願人 | 000216162 天野製菓株式会社 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 |
| (22) 出願日 | 平成10年(1998)3月31日 | (72) 発明者 | 山口 庄太郎 イギリス、22 キャンスタブル ロード イートン、ナルニッチ NR 4 6 RN |

(54) 【発明の名称】 酵素による蛋白質の架橋法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、酵素を用いる蛋白質の新規な架橋法に関する。

【構成】 ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼなどが含まれるマルチ銅オキシダーゼを用いる蛋白質の新規な架橋法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マルチ銅オキシダーゼを有効成分とすることを特徴とする蛋白質架橋化剤。

【請求項2】 マルチ銅オキシダーゼがラッカーゼ及び／又はビリルビンオキシダーゼである請求項1記載の蛋白質架橋化剤。

【請求項3】 マルチ銅オキシダーゼを蛋白質に作用させ、蛋白質を架橋高分子化させる新規な蛋白質架橋法。

【請求項4】 マルチ銅オキシダーゼがラッカーゼ及び／又はビリルビンオキシダーゼである請求項3記載の蛋白質架橋化法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酵素を用いる蛋白質の新規な架橋法に関する。更に詳細には、ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼなどが含まれるマルチ銅オキシダーゼを用いる蛋白質の新規な架橋法に関する。

【0002】 また、本法により製造される架橋、高分子化された、或いはゲル化された蛋白質素材は、魚肉すり身、蒲鉾、魚肉・畜肉ソーセージ、豆腐、麺類、製菓・製パン、食品接着剤、肉シート状食品、ヨーグルト、ゼリー、チーズなどの食品加工分野に用いられる。更に、新規な蛋白質由来素材として化粧品、マイクロカプセルの素材、固定化酵素等の担体などを含む広範な産業に用いられる。

【0003】

【従来の技術】 蛋白質を架橋反応により高分子化せしめる可能性を有する酵素としては、従来よりトランスグルタミナーゼ、リジルオキシダーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、プロテインジスルフィドレダクターゼ、スルフヒドリルオキシダーゼ、リボキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ（チロシナーゼ）、ペルオキシダーゼなどが知られていた（Matheis and Whitaker, J. Food Biochemistry11, 309-327 1987）。

【0004】 上述の、蛋白質を架橋反応により高分子化せしめる可能性を有する酵素の中でトランスグルタミナーゼによる蛋白質の架橋法はよく知られており、微生物由来の安価な、そして反応にカルシウムの存在を必要としないトランスグルタミナーゼが発見されたことにより、食品加工分野を中心に広く利用されていることは周知の通りである（特公平6-65280、日本農芸化学会誌69巻10号1301-1308頁）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながらトランスグルタミナーゼによる蛋白質架橋反応には以下のような問題点があった。即ち、トランスグルタミナーゼは、蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシル基と、リジン残基の ϵ -アミノ基の間で生ずるアシル転移反応の結果、蛋白質分子内或いは分子間に橋かけ構造を形成する酵素であるため、蛋白質の種類によっては、グルタミン

残基或いはリジン残基の不足により基質となりにくい蛋白質があった。たとえばアルブミン類の蛋白質はネイティブの状態では、トランスグルタミナーゼの基質となり得なかった。

【0006】 このように、従来、酵素による蛋白質の架橋法として、幾つかの酵素による可能性が指摘されていたが、供給量、コスト、精製の容易さなどからくる実用性のあるものはほとんどなく、唯一微生物由来のトランスグルタミナーゼによる方法においても、蛋白質の種類によっては架橋反応が生ぜず、その用途が制限されたものであった。よって、その他の酵素を用いた蛋白質の架橋方法の開発が望まれていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、セルロブラズミンなどが含まれるマルチ銅オキシダーゼによる蛋白質の架橋反応について検討したところこれらの酵素を用いることによってタンパク質を架橋することができることを見いだした。即ち、本発明者らはトランスグルタミナーゼとは全く反応機構の異なるラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、セルロブラズミンなどが含まれるマルチ銅オキシダーゼによる蛋白質の架橋法を見出したことにより、従来のトランスグルタミナーゼによる蛋白質架橋法では限られていた、対象となる蛋白質の範囲を拡大するとともに、新しい物性、性質を有する蛋白質ゲル化物の製造法を提供するものである。

【0008】 本発明者は、架橋反応により蛋白質を高分子化さらにゲル化せしめる、これまで知られていなかった酵素を広く自然界に検索を行った結果、マルチ銅オキシダーゼに分類される酵素が、蛋白質に直接作用し、高分子化さらにゲル化せしめることを見出し、本発明を完成するに至った。以下、本発明について詳細に説明する。

【0009】 マルチ銅オキシダーゼとは、分子中に複数の銅原子を含有し、ポリフェノール、メトキシフェノール、ジアミン、ビリルビン、アスコルビン酸などを分子状酸素により酸化せしめる一群の酵素である。含まれる銅原子の数は、これまで知られているものは通常2ないし8個であるが、この数は分析時の酵素標品の状態、分析法によりばらつきが見られるため、特に限定されるものではない。マルチ銅オキシダーゼに分類される酵素としては、例えばラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、セルロブラズミンなどが挙げられる。

【0010】 ラッカーゼ（[EC 1.10.3.2]）とは、マルチ銅蛋白質の一種で、O-クウィノール（quinol）、p-クウィノール（quinol）或いはしばしばアミノフェノールやフェニレンジアミンにも作用する、低い基質特異性を有する酵素である。生じたセミキノンは、さらに酵素的

にもしくは非酵素的に反応する。このようなラッカーゼの例としては、漆などの植物や、バクテリアや真菌(Fungi)などの微生物由来のものがあり、微生物由来のラッカーゼとしては例えば、*Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospira*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Pyricularia*, *Trametes*, *Rhizoctonia*, *Rigidoporus*, *Coprinus*, *Psatyrella*, *Myceliophthora*, *Schtalidium*, *Polyporus*, *Phlebia*, *Coriolus*属由来の酵素が挙げられる。

【0011】ビリルビンオキシダーゼ(EC 1.3.3.5)とは、マルチ銅蛋白質の一種で、主としてビリルビンに作用する酵素であり、このようなビリルビンオキシダーゼの例としては、例えば*Penicillium*, *Myrothecium*, *Trachyderma*属由来の酵素が挙げられる。

【0012】アスコルビン酸オキシダーゼ(EC 1.10.3.3)とは、マルチ銅蛋白質の一種で、主としてL-アスコルビン酸に作用する酵素であり、キュウリ、カボチャ、ズッキーニなどの植物や、バクテリアや真菌(Fungi)などの微生物由来のものがある。

【0013】セルロプラズミン(EC 1.16.3.1)とは、マルチ銅蛋白質の一種で、生体中の銅の恒常性維持や、フェロオキシダーゼ活性、アミンオキシダーゼ活性を有する多機能蛋白質であり、動物や鳥類の血清中に存在する。

【0014】なお、マルチ銅オキシダーゼに類似した反応を行う酵素として、チロシナーゼ(カテコラーゼ、EC 1.10.3.1)やフェノラーゼ(クレゾラーゼ、EC 1.14.1.8.1)があり、これらも銅を含有する酵素であるが、前者はカテコール類に作用する酵素、後者は1, 2-ベンゼンジオールが存在する時のみ前者と同様の反応をするものであり、マルチ銅オキシダーゼ群とは異なる酵素である。このことは、近年明らかとなったアミノ酸配列の相同性とX線解析による3次元構造によるグループ分けでも明らかである。

【0015】即ち、マルチ銅オキシダーゼ群の酵素は、銅原子のリガンドアミノ酸として、システイン、ヒスチジン或いはメチオニン(必須ではない)が同定されている(A. Messerschmidt, R. Huber, Eur. J. Biochem., 187, 341-352, 1990)が、チロシナーゼ群酵素の銅のリガンドアミノ酸はヒスチジンのみである(K. Lerch, ACS Symposium Series, 600, 64-80, 1995)。そしてそのリガンドアミノ酸近傍のアミノ酸配列は、それぞれの群内で一定の相同性を有しており、それに比べて二つの群間での相同性は明らかに低い。

【0016】次に、マルチ銅オキシダーゼを用いて行う蛋白質ゲル化方法について説明する。本発明で利用可能なマルチ銅オキシダーゼは、上述したように動物、植物、微生物などいかなる給源由来のものであってもよい。また、微生物の菌体内、菌体外いずれに蓄積されたものであってもよい。さらに自然界に存在するものばかり

りでなく、遺伝子工学的手法、細胞工学的手法により生産されたものであっても、また蛋白質工学的手法により修飾された酵素蛋白質であってよい。また本発明に用いるマルチ銅オキシダーゼは、精製された純度の高いものを利用することが望ましいが、所望の反応を行わしめるのであればいかなる純度であっても良い。またそれらの酵素製剤は、酵素の安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤が添加されているものであってもよい。

【0017】本発明に用いる基質蛋白質は、上記酵素の作用を受けるものであればいかなるものであってもよく、その起源、性状に制約されるものではない。たとえば、植物性蛋白質であれば豆類、穀類由来の蛋白質、動物性蛋白質であればカゼイン、 β -ラクトグロブリンなどの乳蛋白、オボアルブミンなどの卵蛋白、ミオシン、アクチンなどの肉蛋白、血清アルブミンなどの血液蛋白、ゼラチン、コラーゲンなどの結蛋白質があげられる。また、酸、アルカリなどによる化学的、あるいはプロテアーゼなどによる酵素的部分分解蛋白質や、各種試薬による化学修飾蛋白質や、合成ペプチドであってよい。

【0018】これら基質蛋白質は、溶液またはスラリーあるいはペースト状態で反応に供されるが、その濃度は特に限定されるものではなく、目的の蛋白質架橋物の望まれる性状、状態によって適宜選択される。一般に低濃度であれば粘性の増加した溶液あるいは沈殿物、高濃度であればゲル状物を得られるが、1重量%以上であれば十分にゲル化物を得ることができる。またこの基質蛋白質の溶液またはスラリーあるいはペーストは、水溶液に限らず油脂とのエマルジョンであってよく、さらに必要に応じて塩類、糖類、蛋白質、香料、保湿剤、着色料などが添加されたものであってもよい。

【0019】用いられる酵素量、反応の時間、温度、反応溶液のpHなども特に限定されるものではないが、通常、酵素量は蛋白質1gに対し $0.5 \sim 1 \times 10^6$ ユニット、好ましくは $5 \sim 1 \times 10^6$ ユニット、反応温度は $5 \sim 80^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20 \sim 60^\circ\text{C}$ 、反応溶液のpHは $2 \sim 10$ 、好ましくは $4 \sim 8$ で10秒~48時間、好ましくは10分~24時間反応させることにより蛋白質が高分子化した架橋物ないしゲル状物を得ることができる。これらの反応の条件は、目的とする蛋白質架橋物ないしゲル状物の物性、水分含量に応じて適宜選択される。

【0020】またマルチ銅オキシダーゼの反応を促進するメディエーターとして各種ポリフェノール類例えばハイドロキノン(Hydroquinone)、カテコール(Catechol)、グアイヤコール(Guaiacol)、フェルラ酸(Ferulic acid)、バニリン酸(Vanillic acid)、p-クマル酸(p-Coumaric acid)、シリングアルデヒド(Syringaldehyde)、p-フェニレンジアミン(p-Phenylenediamine)などを添加してもよい。

【0021】本発明におけるマルチ銅オキシダーゼによる蛋白質の架橋高分子化反応の機構は、次のように推定される。一般にオキシダーゼの反応は、被酸化物質である基質と分子状酸素の存在下、基質からプロトンが引き抜かれ酸化された基質と水を生ずる反応である。本発明における基質である蛋白質中のアミノ酸側鎖のなかには、チロシンの水酸基、システインのスルフヒドリル基、リジンのε-アミノ基、ヒスチジンのイミダゾール基など酸化されやすい官能基が存在する。一方マルチ銅オキシダーゼのなかで代表的なラッカーゼは、基質特異性が広い酵素としてよく知られている。

【0022】従って、これらの酵素が上記の側鎖官能基に作用した場合より反応性に富んだ官能基が生ずる。例えばチロシンの側鎖は反応性に富んだο-キノンとなり、キノン同士あるいは他のアミノ基やスルフヒドリル基と反応する。スルフヒドリル基同士は酸化されSS架橋を生ずることはよく知られている。またリジンのε-アミノ基は酸化的脱アミドを受け反応性に富んだアルデヒドを生じ、他のアミノ基と Schiff 塩基を形成することもよく知られている。これらの反応が異なった蛋白質間で起こった場合、架橋により高分子化した反応生成物を生じることとなる。

【0023】以下に本発明を、実施例を挙げて説明する。なおラッカーゼの酵素活性測定は、特に断りのない限り2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] (ABTS、ペーリンガー・マンハイム社製)を基質として以下に記載する方法で行った。

【0024】＜活性測定法＞ABTSを1.0mg/mlの濃度で25mMクエン酸緩衝液(pH3.2)に溶解し基質液とする。この基質液3.0mlをキュベットにとり、25℃で予熱後、0.1mlの酵素液を添加、攪拌し、25℃でインキュベートし、1分後と3分後における405nmの吸光度を測定する。この

* 条件下で1分間に405nmの吸光度を1.0 OD増加させる酵素量を1ユニットと定義する。

【0025】

【実施例】実施例1

ヒロイタケ(*Pycnoporus coccineus*)のラッカーゼによる蛋白質の架橋

基質蛋白質として、①ミルクカゼイン(ハマーステン、メルク社製)、②牛血清アルブミン(Armour Pharma社製)、③ゼラチン(和光純薬社製)を用いた。反応は、これら蛋白質を5重量%(終濃度)、50mM(終濃度)カリウム・ナトリウム燐酸緩衝液(pH7.0)およびヒロイタケのラッカーゼ(製品名:ラッカーゼP、フナコシ社製)を基質蛋白質1mg当たり2ユニット含む反応液を攪拌後、37℃で17時間静置して行った。反応終了後、反応液の一部を分取し2~25%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、基質蛋白質の分子量の増加を観察し、架橋化を判定した。

【0026】対照実験として、酵素をStreptovercilliumのトランスグルタミナーゼ(Agric. Biol. Chem., 53巻10号, 2613-2617頁, 1989年に従って調製)、あるいは西洋わさびのペルオキシダーゼ(東京化成社製)を用いた反応も行った。Streptovercilliumのトランスグルタミナーゼは基質蛋白質1mg当たり0.002ユニット添加し、西洋わさびのペルオキシダーゼの場合は基質蛋白質1mg当たり4μg添加するとともにAspergillus nigerのグルコースオキシダーゼ(製品名:グルコースオキシダーゼ「アマノ」1、天野製薬社製)を基質蛋白質1mg当たり4μg及び終濃度10mMのグルコースも同時に添加した。その結果を図1に示し、図1の各レーンの条件は以下の表1に示す。

【0027】

【表1】

| レーン | 基質蛋白質 | 酵素 |
|-----|----------|----------------|
| 1 | カゼイン | 無添加 |
| 2 | カゼイン | トランスグルタミナーゼ |
| 3 | カゼイン | ヒロイタケ・ラッカーゼ |
| 4 | カゼイン | 西洋わさび・ペルオキシダーゼ |
| 5 | 牛血清アルブミン | 無添加 |
| 6 | 牛血清アルブミン | トランスグルタミナーゼ |
| 7 | 牛血清アルブミン | ヒロイタケ・ラッカーゼ |
| 8 | 牛血清アルブミン | 西洋わさび・ペルオキシダーゼ |
| 9 | ゼラチン | 無添加 |
| 10 | ゼラチン | トランスグルタミナーゼ |
| 11 | ゼラチン | ヒロイタケ・ラッカーゼ |
| 12 | ゼラチン | 西洋わさび・ペルオキシダーゼ |

【0028】図1の様にラッカーゼによりいずれの基質蛋白質も架橋高分子化された。これに対し従来知られて

いたStreptovercilliumのトランスグルタミナーゼや西洋わさびのペルオキシダーゼでは、ミルクカゼイン、

ゼラチンに対しては架橋高分子化が見られたが、牛血清アルブミンに対しては架橋高分子化は見られなかった。

【0029】実施例2

カワラタケ(Coriolus versicolor)のラッカーゼの調整
カワラタケ(Coriolus versicolor IF08753)をグルコース3.0%、ペプトン1.0%、磷酸一カリウム0.14%、硫酸マグネシウム・7水和物0.05%、チアミン塩酸塩0.002%、硫酸銅・5水和物からなる培地(pH5.0)200mlに接種し28℃、11日間浸とう培養し、得られた種培養液をグルコース3.0%、ペプトン1.0%、磷酸一カリウム0.14%、硫酸マグネシウム・7水和物0.05%、チアミン塩酸塩0.002%、硫酸銅・5水和物0.002%、消泡剤としてアデカノールLG126(商品名、旭電化社製)0.01%からなる培地(pH5.0)25Lに加え28℃で10日間通気攪拌培養後、濾過により菌体を除去し培養濾液20Lを得た。

【0030】培養濾液を限外濾過膜AIP1010(商品名、旭化成工業社製)で4Lに濃縮し、10 mM磷酸緩衝液(pH6.0)に対して透析した。得られた透析液を同緩衝液で平衡化したDEAE-セファロースCL-6B(商品名、ファルマシア社製)を含むカラムに通し、0~0.5 M食塩の濃度 *20

*勾配をかけながら同緩衝液を流し、ラッカーゼ活性画分を得て酵素液とした。この酵素液の活性は1988.1ユニット/mlであった。

【0031】実施例3

カワラタケ(Coriolus versicolor)のラッカーゼによる蛋白質の架橋

基質蛋白質として、ミルクカゼイン(ハマーステン、メルク社製)、ゼラチン(和光純薬社製)を用いた。反応は、これら蛋白質を1、3及び5重量%(終濃度)、50 mM(終濃度)カリウム・ナトリウム磷酸緩衝液(pH7.0)および実施例2で調製したカワラタケのラッカーゼを基質蛋白質1mg当たり2ユニット含む反応液を攪拌後、37℃で17時間静置して行った。反応終了後、反応液の一部を分取し2~2.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、基質蛋白質の分子量の増加を観察し、架橋化を判定した。その結果を図2に示し、図2の各レーンの条件は以下の表2に示す。

【0032】

【表2】

| レーン | 基質蛋白質(濃度) | 酵素 |
|-----|-------------|-------------|
| 1 | カゼイン(5w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 2 | カゼイン(3w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 3 | カゼイン(1w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 4 | カゼイン(3w/v%) | 無添加 |
| 5 | ゼラチン(5w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 6 | ゼラチン(3w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 7 | ゼラチン(1w/v%) | カワラタケ・ラッカーゼ |
| 8 | ゼラチン(3w/v%) | 無添加 |

【0033】結果、図2の様にいずれの基質蛋白質、濃度においても蛋白質が架橋高分子化された。蛋白質濃度が高いほど架橋高分子化の程度は高く、濃度が高くなるにつれ反応生成物の粘度は高くなり、1重量%のものでは反応物の入った容器を倒置しても流れ落ちず、5重量%のものでは強固な弾性のあるゲル化物が生成された。

【0034】実施例4

Myrothecium verrucariaのビリルビンオキシダーゼによる蛋白質の架橋

基質蛋白質として、①ミルクカゼイン(ハマーステン、メルク社製)、②ゼラチン(和光純薬社製)、③牛血清アルブミン(Armour Pharma社製)、を用いた。反応は、これら蛋白質を5重量%(終濃度)、50 mM(終濃度)カリウム・ナトリウム磷酸緩衝液(pH7.0)およびMyrothecium verrucariaのビリルビンオキシダーゼ(BO-3、天野製薬社製)およびその組換えビリルビンオキシダーゼを含む反応液を攪拌後、37℃で17時間静置して行った。反応終了後、反応液の一部を分取し2~25%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動に供し、基質蛋白質の分子量の増加を観察し、架橋化を判定した。Myrothecium verrucariaのビリルビンオキシダーゼは基質蛋白質1mg当たり2.9ユニット添加した。組換えビリルビンオキシダーゼは、宿主がAspergillus oryzaeのもの及び同じくPenicillium camembertiiのもの2種類を用い、前者は基質蛋白質1mg当たり3.0ユニット、後者は3.6ユニット添加した。

【0035】組換えビリルビンオキシダーゼは、特開平6-245777に記載の方法で形質転換体を取得、培養し、得られた培養濾液を限外濾過膜AIP1010(商品名、旭化成工業社製)で濃縮し、10 mM磷酸緩衝液(pH6.0)に対して透析した。得られた透析液を同緩衝液で平衡化したDEAE-セファロースCL-6B(商品名、ファルマシア社製)を含むカラムに通し、0~0.5 M食塩の濃度勾配をかけながら同緩衝液を流しビリルビンオキシダーゼ活性画分を得た。この画分を遠心型限外濾過膜マクロセップ3K(商品名、バル・フィルترون社製)で濃縮後、同緩衝液で平衡化したセファクリルS-200(商品名、ファルマシア社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流してビリ

ルビンオキシダーゼ活性画分を得た。この画分を遠心型 * 3に示す。

限外濾過膜マクロセップ3 Kで濃縮し酵素液とした。そ 【0036】

の結果を図3に示し、図3の各レーンの条件は以下の表* 【表3】

| レーン | 基質蛋白質 | 酵素 |
|-----|----------|----------------------------|
| 1 | カゼイン | Myrothecium・ビリルビンオキシダーゼ |
| 2 | カゼイン | Penicillium・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 3 | カゼイン | Aspergillus・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 4 | カゼイン | 無添加 |
| 5 | 牛血清アルブミン | Myrothecium・ビリルビンオキシダーゼ |
| 6 | 牛血清アルブミン | Penicillium・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 7 | 牛血清アルブミン | Aspergillus・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 8 | 牛血清アルブミン | 無添加 |
| 9 | ゼラチン | Myrothecium・ビリルビンオキシダーゼ |
| 10 | ゼラチン | Penicillium・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 11 | ゼラチン | Aspergillus・組換えビリルビンオキシダーゼ |
| 12 | ゼラチン | 無添加 |

【0037】結果、図3の様にいずれのビリルビンオキシダーゼによっても、いずれの基質蛋白質に対しても、蛋白質の架橋高分子化が見られた。

【0038】実施例5

*Rigidoporus zonalis*のラッカーゼ、エビタケ(*Trachydema tunodae*)のビリルビンオキシダーゼによる蛋白質の架橋

基質蛋白質として、①ミルクカゼイン(ハマーステン、メルク社製)、②牛血清アルブミン(Armour Pharma社製)を用いた。反応は、これら蛋白質を5重量%(終濃度)、50 mM(終濃度)カリウム・ナトリウム磷酸緩衝液(pH7.0)および*Rigidoporus zonalis*のラッカーゼ(宝酒造社製)もしくはエビタケのビリルビンオキシダーゼ(宝酒造社製)を含む反応液を攪拌後、37℃で17時※

20※間静置して行った。反応終了後、反応液の一部を分取し2~25%ゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、基質蛋白質の分子量の増加を観察し、架橋化を判定した。

【0039】用いた酵素量は、*Rigidoporus zonalis*のラッカーゼの場合は基質蛋白質1mg当たり2.22ユニットまたは0.222ユニットまたは0.022ユニットとし、エビタケのビリルビンオキシダーゼの場合は基質蛋白質1mg当たり5.58ユニットまたは0.558ユニットまたは0.056ユニットとした。その結果を図4及び図5に示し、図4及び図5の各レーンの条件は以下の表4及び表5に示す。

【0040】

【表4】

| レーン | 基質蛋白質 | 酵素(酵素添加量) |
|-----|----------|--------------------------------------|
| 1 | カゼイン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(2.22ユニット) |
| 2 | カゼイン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(0.222ユニット) |
| 3 | カゼイン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(0.022ユニット) |
| 4 | カゼイン | 無添加 |
| 5 | 牛血清アルブミン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(2.22ユニット) |
| 6 | 牛血清アルブミン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(0.222ユニット) |
| 7 | 牛血清アルブミン | <i>Rigidoporus</i> ・ラッカーゼ(0.022ユニット) |
| 8 | 牛血清アルブミン | 無添加 |

【0041】

【表5】

| レーン | 基質蛋白質 | 酵素 (酵素添加量) |
|-----|----------|-----------------------------|
| 1 | カゼイン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(5.58ユニット) |
| 2 | カゼイン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(0.558ユニット) |
| 3 | カゼイン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(0.056ユニット) |
| 4 | カゼイン | 無添加 |
| 5 | 牛血清アルブミン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(5.58ユニット) |
| 6 | 牛血清アルブミン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(0.558ユニット) |
| 7 | 牛血清アルブミン | エビタケ・ビリルビンオキシダーゼ(0.056ユニット) |
| 8 | 牛血清アルブミン | 無添加 |

【0042】結果、図4、図5の様にどちらの酵素によっても、両基質蛋白質に対して蛋白質の架橋高分子化が見られた。

【0043】実施例6

ヒイロタケ(Pycnoporus coccineus)のラッカーゼによるソーセージの製造

ミンチ豚赤肉(3mm)60重量%、ミンチ豚脂肪(3mm)20重量%、氷水17重量%、食塩1.5重量%、調味料0.5重量%及び香辛料0.5重量%に、ヒイロタケ(Pycnoporus coccineus)のラッカーゼ1000ユニット/g蛋白質を加えた後サイレントカッターで混和後、直径約2cmのケーシングに充填し、55°Cで60分間熟成・乾燥し、60°Cで15分間スモークした後更に75°Cで30分間蒸煮した。冷却後のゲル強度、官能検査を行った。ラッカーゼを添加しない場合と比較して明らかに良好なソーセージが調製された。

【0044】実施例7

カワラタケのラッカーゼによる蒲鉾の製造

魚肉(水分約80%)100重量部に砂糖9重量部、グルタミン酸ナトリウム1重量部及びみりん2%にカワラタケのラッカーゼ400ユニット/g蛋白質を加えてよく練り合わせた後板にもり、80~90°Cで40分間蒸煮する。冷却後のレオメータを用いて弾力を測定した。ラッカーゼを添加しない場合と比較して明らかに良好な弾力を示す蒲鉾が製造された。

【0045】実施例8

ヒイロタケ(Pycnoporus coccineus)のラッカーゼに代えてMyrothecium verrucariaのビリルビンオキシダーゼを

用いたソーセージの製造

実施例6と同様にしてソーセージを調製した。得られた製品はゲル強度、官能検査の結果、ビリルビンオキシダーゼを添加しない場合と比較して明らかに良好な結果を示した。

【0046】

【発明の効果】本発明の酵素による蛋白質の架橋法によれば、これまで唯一実用化されている微生物トランスグルタミナーゼによっては架橋出来なかったアルブミンなどの蛋白質をも架橋高分子化する事が出来る。また、反応機構もトランスグルタミナーゼとは異なったものと考えられるため、新たな品質を有する蛋白質高分子化物やゲル状物が製造できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを示す図である。

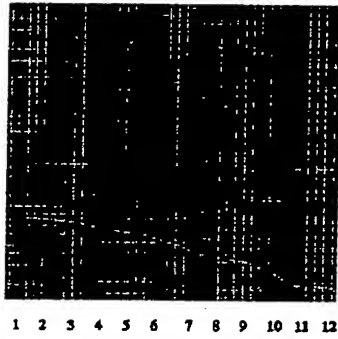
【図2】実施例3における、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを示す図である。

【図3】実施例4における、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを示す図である。

【図4】実施例5における、Rigidoporus zonalisのラッカーゼを用いた場合のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを示す図である。

【図5】実施例5における、エビタケ(Trachyderma tunodae)のビリルビンオキシダーゼを用いた場合のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動パターンを示す図である。

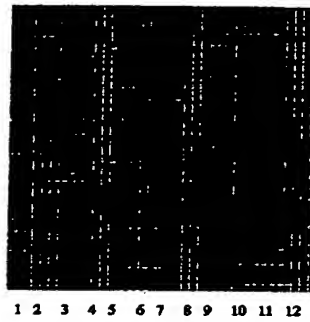
【図1】



【図2】



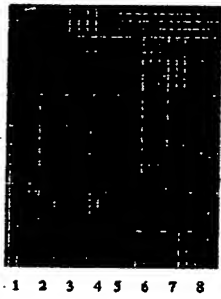
【図3】



【図4】



【図5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.